

胃癌の増殖能と悪性度：腫瘍増殖率の意義とその臨床応用

金沢大学医学部外科学第二講座（主任：宮崎逸夫教授）

大 山 繁 和

（平成2年7月11日受付）

術前における腫瘍増殖能の把握を目的に、細胞増殖動態の解析より腫瘍増殖能に対する最も良い指標を検索するとともに、その臨床的意義を検討した。対象は、1986年4月から1989年10月までに教室で切除された胃癌172例である。全例に bromodeoxyuridine (BrdUrd) が静脈内投与され、うち56例には、切除6-8時間前に BrdUrd を投与し、移動追跡法による細胞動態の解析を施行した。細胞動態は、Fluorescein isothiocyanate (FITC) (BrdUrd)-PI (DNA) 二重染色後、フローサイトメトリイを用いて行った。その結果、胃癌における DNA 合成時間は、 17.4 ± 7.2 時間で、正常粘膜 (10.9 ± 1.1 時間) に比し延長していた。なかでも BrdUrd 標識率が高値を示す例や DNA 異数倍体では、DNA 合成時間の延長が顕著で、DNA 合成時間は、BrdUrd 標識率、DNA 指標 (DNA index) と有意な相関関係を示した。腫瘍増殖率の指標を重回帰分析にて検索したところ、BrdUrd 標識率と DNA 指標の比が最も良い指標であった。また、腫瘍増殖率とその推測値 (BrdUrd 標識率 / DNA 指標) は、 $r=0.834$, $p<0.0001$ ときわめて有意に相関した。この腫瘍増殖率推測値は、肝転移、リンパ節転移と密接に関連しており、Cox の比例ハザードモデルを用いた予後因子解析の結果、腫瘍増殖率推測値は、肝転移、腹膜播種、リンパ節転移を凌ぐ、最も優位な予後因子であった。この因子の臨床応用を目的に、生検材料を用いて、生体外 (in vitro) BrdUrd 標識を施行し、生体内 (in vivo) の成績との比較を行ったところ、両者は極めてよく一致した ($r=0.960$, $p<0.0001$)。以上より、腫瘍増殖率が、転移と密接に関連し、癌の悪性度を最も良く反映する因子であることが推測され、生検材料からの推測が可能であることより、臨床応用の可能性が示唆された。

Key words cell kinetics, proliferation rate, bromodeoxyuridine, gastric cancer

腫瘍の増殖活性は、種々の悪性腫瘍でその予後因子としての有用性が報告されており¹⁻⁷、その指標の一つである腫瘍マーカーは、有用な癌の診断・治療の指標ともなっている^{8,9}。しかし、腫瘍の増殖活性を最も正確に表現する腫瘍倍加時間は、測定可能病変を必要とし、また、腫瘍マーカーにおいてもその産生を必要とする。胃癌における腫瘍マーカーの陽性率は、20-30%に過ぎず、しかも臨床的に高度に進行した症例が多い¹⁰。測定可能病変についても、肝転移巣以外は、計測が困難な場合が多く、手術療法が施行されるほと

んど症例は、その腫瘍の増殖能・転移能が把握されないままに手術が行われているのが現状である。

そこで、腫瘍の増殖を細胞動態の面より解析し、もっとも有用な腫瘍増殖能の指標を検索すると共に、その予測の可能性について検討した。さらに、得られた指標の臨床的意義を検討した。

対象および方法

I. 対 象

1986年4月から1989年10月までに金沢大学第二外科

Abbreviations: BrdUrd, bromodeoxyuridine; DI, DNA index; LI, BrdUrd labeling index; FITC, fluorescein isothiocyanate; pPR, predicted proliferation rate; PR, proliferation rate; Tg, generation time; Ts, DNA synthesis time

教室で切除された胃癌172例を対象とした。男性101例、女性71例で、早期胃癌74例、進行胃癌98例である。全例に拡大リンパ節郭清を伴う胃全摘術あるいは胃亜全摘術が施行された。胃切除後、1ヶ月から4年までの間に死亡した症例は68例で、他病死は検討より除外した。

II. 方 法

1. Bromodeoxyuridine (BrdUrd) の生体内投与
手術前に BrdUrd RADIBUD[®], Takeda Chemical Ltd, Osaka, Japan) 200-1000 mg を生理食塩水100 ml に溶解し、30分間ですみやかに静脈内投与した。通常は、開腹直前に投与し、移動追跡法による細胞動態解析の場合は、開腹6-8時間前に投与した。

2. BrdUrd の生体外標識

BrdUrd の生体外標識の方法は、Sasakiら¹³⁾に準じ、術前の胃内視鏡検査の生検材料を用いて行った。チミジンを含まない培養液 RPMI1640 (GIBCO, Grand Island, NY, USA) 2ml 中に、約1mm 角の腫瘍組織片(生検材料5-10個)を、BrdUrd が最終濃度400 μ M となるように添加し、20%胎児ウシアルブミン0.5mlを加えた後、carbogen (95%O₂, 5%CO₂)にて3気圧下1時間培養した。細胞の処理方法、解析方法は、切除標本と同様である。

3. 細胞処理

切除新鮮標本より、約5mm 角の癌組織を採取し、70%エタノールにて固定した。30分以上固定後、1-2mm角に細切し、0.5%ペプシン溶液(pH 1.5)にて37°C、2時間酵素処理し、単離細胞浮遊液を作成した。

4. 蛍光染色

蛍光染色は、間接免疫染色にて行った。まず、単離細胞浮遊液を、2規定塩酸で20分間反応させ、DNAを変性させた後、0.1規定ホウ酸ナトリウムで10分間中和した。その後、一次抗体として抗BrdUrd抗体(Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)を、二次抗体としてFluorescein isothiocyanate (FITC)標識抗マウスヤギ IgG (Cappel Laboratories Inc., CA, USA)をおのおの1 $\times 10^6$ 個の癌細胞に対し20 μ l 使用し、DNA染色を、propidium iodide (PI) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 20 μ g/mlにて行った。

5. 細胞動態解析

1) 正常粘膜

正常粘膜の場合は、癌組織と異なり、塗末標本から粘膜上皮のみのBrdUrd標識率を算出することが困難であることから、免疫組織染色を施行し、BrdUrd

標識率を算出した。すなわち、6 μ mホルマリン固定パラフィン切片を脱パラ後、2規定塩酸を20分間反応させた後、0.1規定ホウ酸ナトリウムにて10分間中和した。さらに、0.05%プロテアーゼ処理後、0%正常ヤギ血清で30分間反応させ、一次抗体として抗BrdUrd抗体を、二次抗体として、ビオチン化マウスIgG (TAGO, Burlingame, CA, USA)をおのおの1時間反応させ、avidine-biotin-peroxidase complex (Vector Lab., Burlingame, CA, USA)を1時間反応させた。3,3'-diaminobenzidine溶液にて発色後、ヘマトキシリンにて核染色を行った。BrdUrd標識率は、胃粘膜上皮細胞2000個に占める、BrdUrd標識細胞の比率(%)より算出した。DNA合成時間は、移動追跡法にて求め、その成績より世代時間を算出した。

2) 癌組織

癌組織における細胞動態の解析は、フローサイトメトリー EPICS-C (Coulter Electronics Inc. Hialeath, FL, USA)を用いて行った。DNA倍体様式(DNA ploidy pattern)を、検体内に含まれる間質細胞を内部標識: 2Cとして、その癌細胞のG0G1ピークのDNA量の比DNA指標(DNA index, DI)1.0のものをDNA倍体(DNA diploidy)、それ以外のものをDNA異数倍体(DNA aneuploidy)とした(図1)。1検体につき約2万個の細胞を測定した。BrdUrd標識率は、BrdUrd/DNA散布図より、G0G1, S, G2M各期の比率をEPICS-C内蔵のプログラムSTAT PACを用いて算出し、全細胞数に占める標識細胞の比率(%)とした。移動追跡法の場合は、G0G1期の標識細胞の1/2とS-G2M期の標識細胞を加えたものをBrdUrd標識率とした。DNA倍体の場合は、同一検体より得られた塗末標本より正常細胞の混入比率を求め、標識率の補正を行った。(図2)。

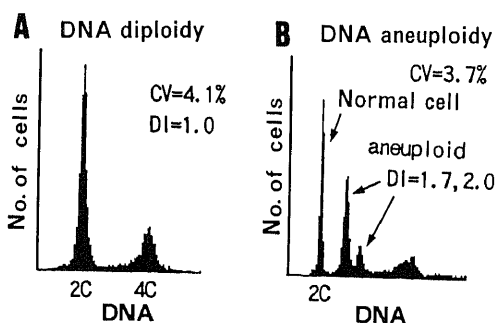


Fig. 1. Classification of DNA ploidy pattern of gastric carcinomas studied in this work. A, DNA diploidy; B, DNA aneuploidy.

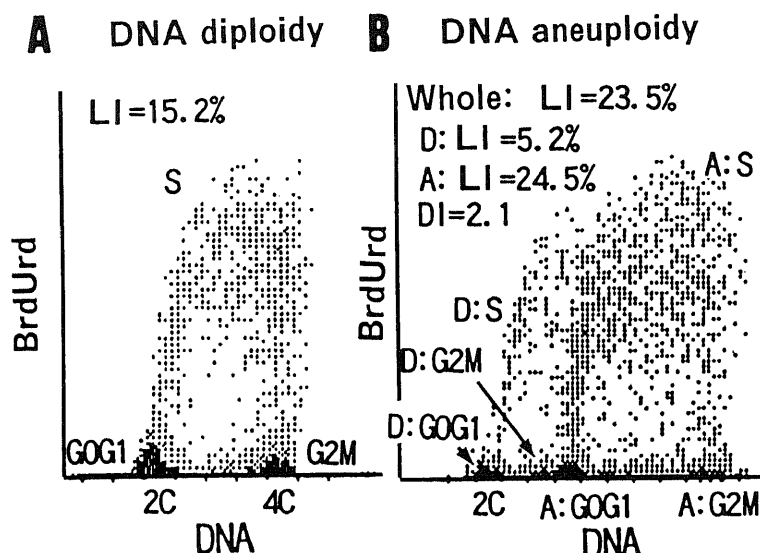


Fig. 2. Cell cycle analysis based on bivariate BrdUrd/DNA distribution of DNA diploidy (A) and DNA aneuploidy (B). BrdUrd LI for diploidy was recalculated based on the percentage of normal cells in a tumor tissue as determined by light microscopy of the smear. For aneuploid tumors, BrdUrd LI was calculated not only for the whole tumor tissue but also for each population when possible.

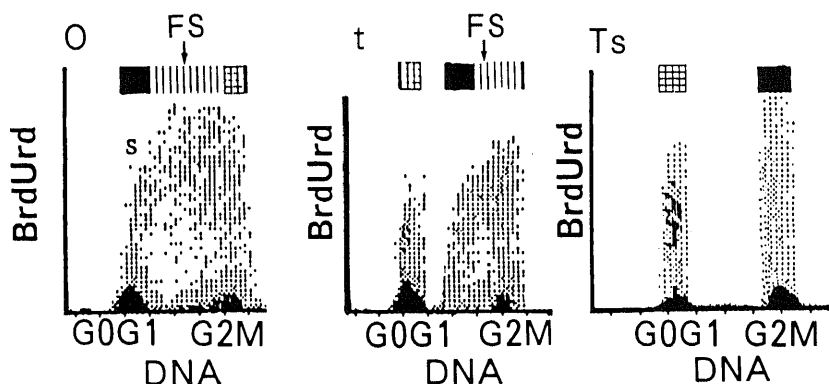


Fig. 3. Migration chase method used for the evaluation of DNA synthesis time. This figure shows a representative result of the method. Assumptions are made that at the time of BrdUrd infusion the mean DNA content of FITC-labeled cells in S-phase is the middle between G0G1 and G2M peak, with their relative movement at 0.5 and the movement of FITC-labeled cells through the S-phase is constant. At the time of tumor sampling (t), FITC-labeled S-phase cells move toward G2 and some of them recycle to G0G1, following one mitotic cycle. Their new position is determined from their mean DNA content to estimate their relative movement (RM2). At the DNA synthesis time (Ts), all FITC labeled cells are expected to have G2. Ts is calculated by the formula $Ts = 0.5 \div (RM2 - 0.5) \times t$, and generation time (Tg) (potential doubling time) is calculated by the formula $Tg = Ts / LI$. The proliferation rate (PR) is the reciprocal of Tg.

6. 移動追跡法

移動追跡法は、細胞動態解析法のうちの瞬間標識法の一つである¹²⁾。移動追跡法の原理を図3に示す。本法は、時間0における標識細胞の midpoint が G0G1, G2M 期の midpoint にあると仮定し、S 期の速度が一定であることを前提としている。時間 t における S 期の標識細胞の右方への偏位 (相対移動 2, relative movement 2, RM2) より、DNA 合成時間 (DNA synthesis time, Ts) を算出する。DNA 合成時間は、全ての BrdUrd 標識細胞が G2 期に移行する時間に相当する。

$$Ts = 0.5 \div (RM2 - 0.5) \times t$$

また、DNA 合成時間と BrdUrd 標識率より世代時間 (generation time, Tg) を算出する。

$$Tg = Ts / LI$$

増殖率 (proliferation rate, PR) は、この世代時間の逆数である。

7. 統計学的検定

得られた計算値は全て平均値±標準偏差を求め、各群の平均値の差の検定には、Student's t 検定を用いた。生存曲線は、一般化 Wilcoxon 検定を用いた。BrdUrd 標識率および腫瘍増殖率推測値のカットオフ値の決定は、Cox モデル¹³⁾を用いて行い、Cox 比例ハザードモデルにて¹³⁾、予後因子の解析を行った。増殖率の指標の解析には、重回帰分析を用いた。

8. 用語

用語は胃癌取扱規約¹⁴⁾に従った。

9. インフォームド コンセント

BrdUrd の投与に当たっては、投与前に患者もしくは患者の家族に BrdUrd 投与の目的およびその副作用について説明し承諾を得た。

成 績

I. 移動追跡法による正常粘膜および癌組織の細胞動態解析

移動追跡法による細胞動態の解析は、正常粘膜42例、癌組織56例に行った。癌組織56例のうちわけは、DNA 倍体18例、DNA 異数倍体38例である。正常粘膜の BrdUrd 標識率は、 $6.9 \pm 1.8\%$ 、癌組織では $14.5 \pm 11.5\%$ と癌組織において高値を示した。図4に同一症例の正常粘膜と癌組織のおおのの BrdUrd/DNA 散布図を示す。癌組織では正常粘膜に比し標識細胞の右方への偏位が少なく、正常粘膜の DNA 合成時間の延長が認められた。世代時間は、両者の比で算出されるため、正常粘膜と癌組織全体では、ほとんど差が見られず、7.6-7.7日であった。正常粘膜の増殖帯の BrdUrd 標識率は、42.5%であり、増殖帯の世代時間は約1日であった。癌組織のなかでも DNA 異数倍体腫瘍は、BrdUrd 標識率が $21.1 \pm 12.8\%$ と DNA 倍体腫瘍 ($11.5 \pm 9.8\%$) に比し高値を示した。図5は、多

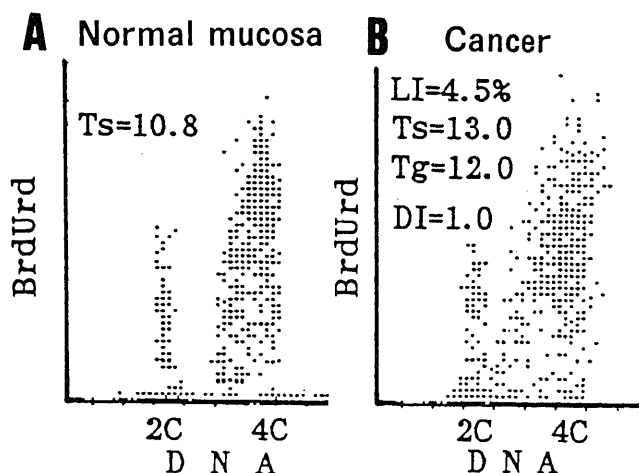


Fig. 4. Bivariate BrdUrd/DNA distributions for normal gastric mucosa (A) and gastric cancer (B) obtained from a single cancer patient. FITC-labeled S-phase cells obtained from normal mucosa move to G2 more rapidly than the cells obtained from cancer tissue. Thus, DNA synthesis time prolonged in cancers.

発胃癌症例の DNA 倍体腫瘍と DNA 異数倍体の腫瘍 BrdUrd/DNA 散布図である。DNA 異数倍体腫瘍では、DNA 倍体腫瘍に比し DNA 合成時間の延長が認められる。世代時間は、DNA 倍体腫瘍が 8.7 ± 5.7 であったのに対し、DNA 異数倍体腫瘍では 5.2 ± 5.7 日と有意に短かった (表 1)。

II. DNA 合成時間

1. DNA 合成時間と BrdUrd 標識率

DNA 合成時間と BrdUrd 標識率は、 $r=0.453$, $p<0.0005$ と相関した (図 6)。

2. DNA 合成時間と DNA 指標は、 $r=0.534$, $p<0.0005$ と相関した (図 7)。すなわち、S 期細胞の多い腫瘍や DNA 異数倍体腫瘍では、DNA 合成時間

が延長していることを示す成績であった。

III. 腫瘍増殖率の推測

腫瘍の増殖率は、世代時間の逆数、つまり、BrdUrd 標識率/DNA 合成時間で求められる。DNA 合成時間は個々の症例により異なり、生体内 (in vivo) でしか求められない。そこで、増殖率が生体外 (in vitro) で得られる他の因子のうち何に最も良く相関するか、重回帰分析を用いて解析した (表 2)。その結果、増殖率の最も良い指標は、BrdUrd 標識率/DNA 指標で、DNA 合成時間を除けば、次いで BrdUrd 標識率であった。また、増殖率は、BrdUrd 標識率/DNA 指標と $r=0.863$, $p<0.0001$ できわめて有意に相関した (図 8)。

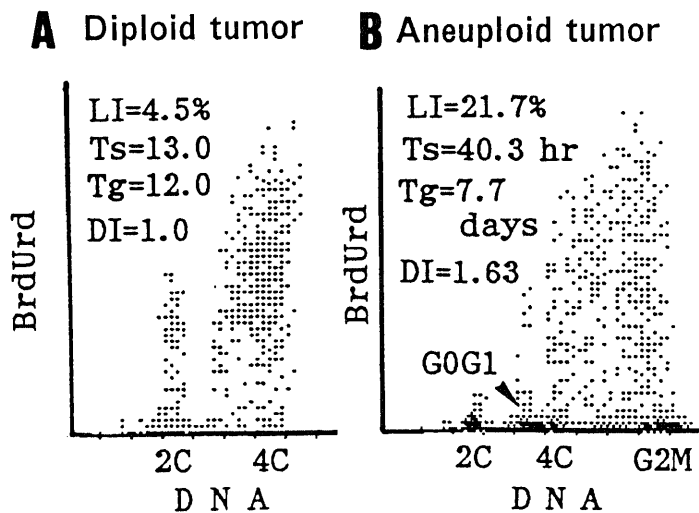


Fig. 5. Bivariate BrdUrd/DNA distributions for DNA diploid tumor (A) and DNA aneuploid tumor (B) obtained from a single patient with multiple gastric cancers. FITC-labeled S-phase cells of DNA diploid tumor move to G2 more rapidly than the cells of DNA aneuploid tumor. DNA synthesis time is shorter in DNA diploid tumor cells than DNA aneuploid tumor cells.

Table 1. Cell kinetics of normal gastric mucosa and gastric cancers classified with DNA ploidy studied with migration chase method

	No. of patients	BrdUrd LI	DNA synthesis time	Generation time
Normal				
Gastric mucosa	42	$6.9 \pm 1.8\%$	10.9 ± 1.1 hrs	7.7 ± 2.2 days
Gastric cancer	56	$14.5 \pm 11.5\%$]*	17.4 ± 7.2 hrs]*	7.6 ± 5.2 days
DNA diploidy	18	$11.5 \pm 9.8\%$]*	15.9 ± 6.6 hrs]*	8.7 ± 5.7 days]*
DNA aneuploidy	38	$21.1 \pm 12.8\%$]*	20.6 ± 7.5 hrs]*	5.2 ± 2.7 days]*

* $p<0.01$

IV. 腫瘍増殖率推測値と臨床病理学的所見

胃癌172例を対象に、BrdUrd 標識率と DNA 指標より求められた腫瘍増殖率推測値 (predicted proliferation rate, pPR) の臨床的意義を検討した。腫瘍増殖率推測値は、肝転移例、リンパ節転移例で高値を示し、漿膜露出例、リンパ管・静脈侵襲陽性例で高値を示した。しかし、組織型・浸潤様式などでは、差が見られなかった。また、DNA 異数倍体腫瘍では、DNA 倍体腫瘍に比し高値を示した。このように、臨床病理組織学所見との関連では、腫瘍増殖率推測値は、BrdUrd 標識率と同様の成績を示した (表3)。

V. 腫瘍増殖率推測値と予後

腫瘍増殖率推測値の予後因子としての評価を、一般化 Wilcoxon 検定および Cox 比例ハザードモデルを用いて解析した (表4)。単因子解析では、肝転移、腹膜播種、漿膜露出、リンパ節転移、組織型、壁深達度、DNA 倍体様式、BrdUrd 標識率、腫瘍増殖率推測値が有意な予後因子であった。しかし、多変量解析の結果では、腫瘍増殖率推測値が予後因子として最も重要であり、肝転移、漿膜露出、組織型がそれに次ぐ因子であった。腫瘍増殖率推測値が10%未満の症例

と、10%以上の症例についてその予後を検討したところ、前者の4年生存率が82.3%であったのに対し、後者は16.2%と比べて予後不良であった ($p < 0.0001$, 図9)。

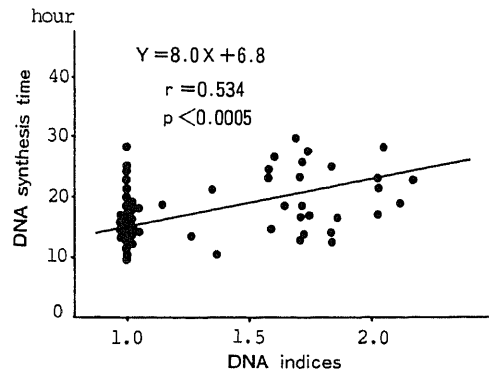


Fig. 7. Correlation between DNAs synthesis time and DNA indices. DNA synthesis time correlated with DNA indices significantly ($r = 0.543$, $p < 0.0005$).

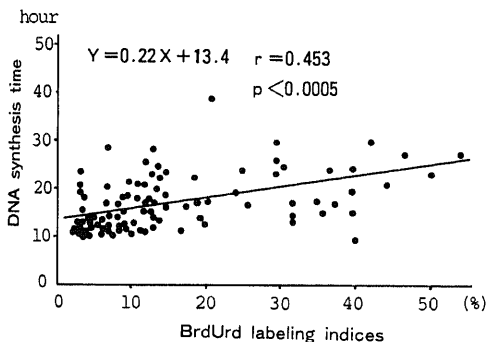


Fig. 6. Correlation between DNA synthesis time and BrdUrd labeling indices. DNA synthesis time correlated with BrdUrd LI significantly ($r = 0.453$, $p < 0.0005$).

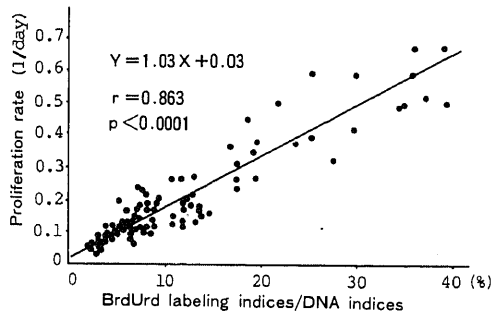


Fig. 8. Correlation between proliferation rate and BrdUrd labeling indices/DNA indices. proliferation rate correlated with BrdUrd labeling indices/DNA indices significantly ($r = 0.863$, $p < 0.0001$). This figure shows that BrdUrd labeling indices/DNA indices can be the most significant indicator for proliferation rate.

Table 2. Multiple regression analysis: Predictive value for proliferation rate in 56 patients with gastric cancer

Variable	Standardized partial regression coefficient	F value	P value
DNA index	0.04588	0.040	0.8427
1/DNA index	-0.14107	0.342	0.5612
BrdUrd LI	0.19105	1.690	0.0996
DNA synthesis time	-0.12004	5.206	0.0269
1/DNA synthesis time	0.22209	16.079	0.0002
BrdU LI/DNA index	0.85011	36.341	0.00001

VI. 腫瘍増殖推測の臨床応用

胃癌30例について、生体外 BrdUrd 標識を施行し、生体内の成績との比較を行った。その結果、生体外で得られた腫瘍増殖率推測値は、生体内の腫瘍増殖率推測値と $Y=1.03X+0.032$, $r=0.960$, $p<0.0001$ という値を示し、きわめて良く一致した (図10)。

考 察

腫瘍の悪性度を規定する因子には、その局所での増殖能、浸潤能、他臓器への転移能などが挙げられる。そのうち転移は、予後を規定する最も重要な因子であるが、転移巣の形成には、標的臓器内での増殖が必須

であり、その意味でも、癌細胞の増殖動態の解明は、重要な問題である。Steel¹⁹によれば、ヒト腫瘍における細胞喪失は、約90%にものぼり、腫瘍の生長と増殖は必ずしも一致しない。腫瘍の増殖は、より本質的な癌細胞の増殖能を反映するものと考えられ、重要な意義を有する。従来、増殖活性の指標として、S期細胞比率が最も良く用いられてきた^{10,17}。しかし、癌細胞では、DNA 合成時間が長いことが報告されており、S期細胞比率がそのまま細胞の増殖活性を正確に表現しているかは未だ明らかではない。また、癌細胞におけるDNA 合成時間に関して多数症例を用いた詳細な研究は見られない。そこで、本研究では、まず、癌にお

Table 3. Relationship between clinicopathological findings and bromodeoxyuridine labeling indices or predicted proliferation rate in 172 patients with gastric cancer

	No. of patients	BrdUrd labeling indices	Predicted proliferation rate
Hepatic metastasis			
Negative	161	11.4±7.1%	8.6±4.9%
Positive	11	17.5±8.1%] $p<0.05$	13.4±5.1%] $p<0.01$
Peritoneal metastasis			
Negative	144	11.3±7.3%	8.6±5.1%
Positive	28	13.9±7.2%] NS	10.2±4.8%] NS
Serosal invasion			
Negative	100	10.5±6.3%	8.1±4.0%
Positive	72	13.5±8.3%] $p<0.05$	10.1±6.1%] $p<0.05$
Nodal status			
Negative	74	9.3±5.5%	7.3±3.7%
Positive	98	13.6±8.0%] $p<0.0001$	10.1±5.6%] $p<0.001$
Histologic type			
Well differentiated	100	10.9±6.6%	8.3±4.6%
Poorly differentiated	72	13.0±8.1%] NS	9.7±5.6%] NS
Lymphatic vessel invasion			
Negative	50	9.4±6.1%	7.5±4.3%
Positive	122	12.7±7.6%] $p<0.01$	9.5±5.2%] $p<0.01$
Vessel invasion			
Negative	99	10.3±7.1%	8.1±5.3%
Positive	73	13.8±7.2%] $p<0.01$	10.0±4.5%] $p<0.01$
Gross appearance			
0	74	10.3±6.2%	7.8±3.9%
1.2	33	11.6±6.7%] $p<0.05$	8.8±4.2%] $p<0.05$
3.4	65	13.5±8.5%]	10.1±6.2%]
DNA ploidy			
DNA diploidy	62	7.6±5.6%	7.6±5.6%
DNA aneuploidy	110	14.1±7.2%] $p<0.0001$	9.6±4.6%] $p<0.05$

Table 4. Univariate and Multivariate analysis as prognostic factors based on 172 patients with gastric cancer

Variable	Categories	No. of cases	Univariate analysis		Multivariate analysis	
			Z value	P value	F value	P value
Age	60 years>	72	1.1903	0.23392	0.231	0.63129
	60 years<	100				
Sex	Male	101	0.5365	0.59163	1.364	0.24469
	Female	71				
Hepatic metastasis	Negative	161	5.3253	0.00001	7.386	0.00731
	Positive	11				
Peritoneal metastasis	Negative	144	5.4967	0.00001	3.030	0.08371
	Positive	28				
Serosal invasion	Negative	100	5.8316	0.00001	4.946	0.02757
	Positive	72				
Nodal status	Negative	74	6.4777	0.00001	1.822	0.17907
	Positive	78				
Histologic type	Well differentiated	100	4.4184	0.00001	4.774	0.03038
	Poorly differentiated	72				
Gross appearance	0	74	4.3333	0.00001	0.112	0.73827
	1.2	33				
	3.4	65				
DNA ploidy	DNA diploidy	62	1.9291	0.04971	0.385	0.53603
	DNA aneuploidy	110				
BrdUrd LI	11%>	90	3.0915	0.00199	0.393	0.53185
	11%–17%	48				
	17%<	34				
Predicted proliferation rate	10%>	110	6.9099	0.00001	14.124	0.00024
	10%<	62				

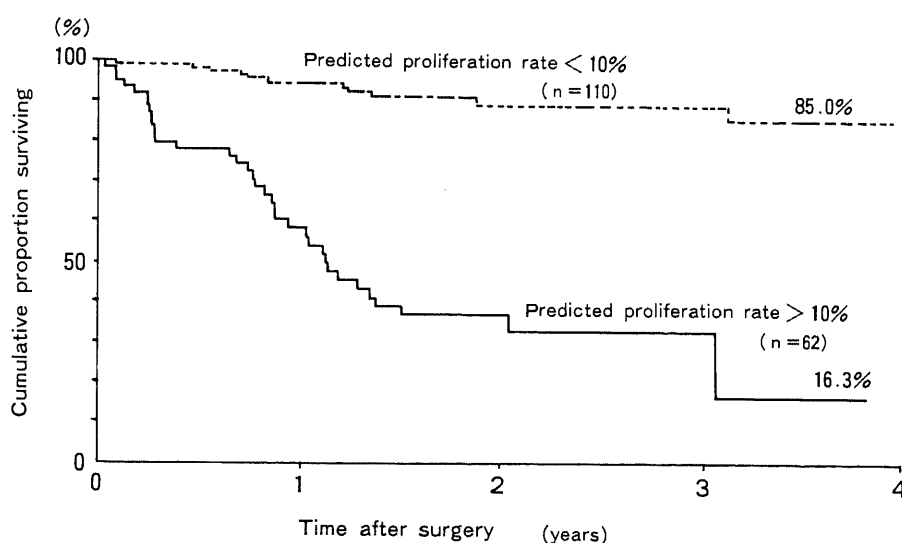


Fig. 9. Survival curves of gastric cancer patients subdivided according to predicted proliferation rate. Proliferation rate was calculated by the formula BrdUrd labeling indices/DNA indices.

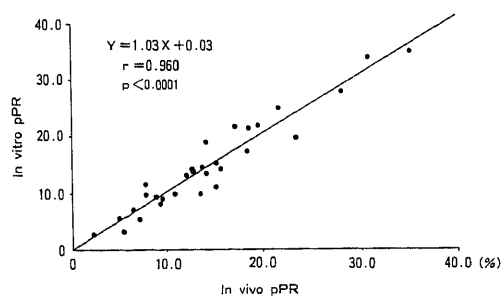


Fig.10. Correlation of the predicted proliferation rates obtained in vivo with the predicted proliferation rates obtained in vitro. Predicted proliferation rates obtained in vitro correlated with those obtained in vivo significantly ($r=0.960$, $p<0.0001$).

ける DNA 合成時間の延長が、他のどの様な因子と相関するか、癌の増殖活性を最も良く表現する因子は何かを解析することとした。

癌の増殖動態の解析には、サイトフルオロメトリーやフローサイトメトリーなどによる細胞周期解析や、 ^3H -チミジン オートラジオグラフィによる S 期細胞比率の解析などが用いられてきた¹²⁾。ヒト癌細胞には種々の程度で休止期の細胞が存在し、最近では、G1 期 (G0細胞) のみならず、細胞周期各期に休止期の細胞が存在することが明らかとなってきた¹³⁾。従って、DNA ヒストグラムからの細胞周期解析より求めた S 期細胞比率は、必ずしも実際の S 期細胞比率とは一致しない可能性が高い。また、 ^3H -チミジンは、半減期のきわめて長いラジオアイソトープであり、ヒトに用いることには問題がある。そこで、チミジンの誘導体で、選択的に S 期細胞に取り込まれる BrdUrd を用いて細胞動態の解析を行った¹⁴⁾。また、出来るだけ客観的に評価するため、フローサイトメトリーを用いて解析した²⁰⁾。

フローサイトメトリーによる細胞周期解析は、培養細胞や、白血病などで行われてきたが、胃癌などの固型癌では殆ど行われていなかった。その理由は、細胞単離の困難さにあった。コラゲナーゼやトリプシンによる細胞単離法も報告されているが、変動係数 (Coefficient of variation, CV) が大きく、精度の高い解析は困難であった。そこで、著者は、アルコール固定後の標本を、37°C、2 時間ペプシン処理する方法を開発した。この処理法では、癌細胞は細胞質がほとんど無く、ほぼ完全な裸核とすることが出来る。本法での平均変動係数は、4.2%であり、培養細胞などでの解析精度などと比べても十分に満足しうるものであった。

細胞動態解析法には、連続標識法、二重標識法、瞬間標識法などがある¹²⁾。移動追跡法は、このうちの瞬間標識法の一つである。サイトフルオロメトリーを用いて解析したのは、Fujita²¹⁾が最初であるが、サイトフルオロメトリーでは、解析が煩雑であり、正確さに欠けている欠点があった。しかし、フローサイトメトリーを用いることにより精度の高い解析結果をうることができ、現在、もっとも簡便な方法である²²⁾。本法で求められた正常粘膜の細胞動態は、諸家の報告¹⁶⁾¹⁷⁾²³⁾と一致しており、本法の成績は信頼に足るものと考えられる。

解析の結果、胃正常粘膜では、DNA 合成速度がほぼ一定であった。しかし、癌組織では種々の程度で DNA 合成時間が延長していた。しかも、その DNA 合成時間の延長は、S 期細胞の多い腫瘍や DNA 異数倍体腫瘍でより顕著であった。癌組織における DNA 合成時間の延長の原因は明らかではないが、癌細胞には DNA 量の増大に加え、染色体の転座、欠失、点突然変異など種々の変異²⁴⁾が認められることより、癌細胞における DNA 複製がより複雑であることが推察される。一般に、DNA 異数倍体腫瘍は、S 期細胞比率も多い²⁵⁾。従って、DNA 合成速度がさらに延長しているものと考えられ、その増殖活性をかなり補正する必要がある。このように、少なくともヒト胃癌では、必ずしも S 期細胞比率は、増殖活性を正確には表現しないと考えられる。細胞の増殖動態を最も正確に表現する指標は、腫瘍増殖率である。この腫瘍増殖率は、S 期細胞比率と DNA 合成時間の比で算出される。しかし、DNA 合成時間の解析は、生体内でしか求められず、BrdUrd の副作用などを考慮すると²⁶⁾広く臨床的に行うことには問題がある。そこで、そのほかの生体外で得られる成績より、増殖率のもっとも良い指標となるものを、重回帰分析を用いて検索した。その結果、S 期細胞比率と DNA 指標の比が、最もよい指標であるという成績が得られた。これは、腫瘍増殖率が S 期細胞比率と DNA 合成時間の比で求められ、DNA 合成時間が DNA 指標に比較的良く相関するためと考えられた。実際に腫瘍増殖率とこれらの比の間には、極めて有意な相関関係が得られた。大腸癌においても同様な成績が得られており²⁶⁾、この腫瘍増殖率の予測は種々の腫瘍に応用可能であることが示唆された。この結果は、あらかじめ S 期細胞比率と DNA 指標が検索可能であれば、術前に腫瘍増殖能の把握が可能であることを意味している。Sasaki ら¹³⁾は、BrdUrd 標識率について、生体内と同様の成績が、生体外で得られることを報告している。また、石川ら²⁷⁾

は、大腸内視鏡生検材料と切除標本における核 DNA 量を測定し、生検材料の個数が 3 個あれば適正な DNA 倍体様式が評価可能であると述べている。そこで、著者は、生検材料 5-10 個を用いて生体外 BrdUrd 標識を行い、BrdUrd 標識率、DNA 倍体様式の両者を評価した。その結果、生体外 BrdUrd 標識法の成績は、生体内の成績ときわめて良く一致した。これらのことより、生検材料を用いて腫瘍の増殖率が予測しうるものと考えられた。

次に、この腫瘍増殖率が臨床上的どのような意味を持つのか、臨床病理学的所見との関連を検索した。その結果、肝転移、リンパ節転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲など転移と関連を有する因子との密接な相関が認められた。転移の確立には、癌細胞の脈管への浸潤、遊離、標的臓器への着床、増殖など種々の過程を必要とする³⁰。細胞の増殖能と転移能との関連について、増殖と転移とは必ずしも相関しないとの報告³¹⁻³³がある一方、S 期細胞がより転移し易く、高いコロニー形成能を有しているという報告³⁴や、増殖関連癌遺伝子である Ha-ras の組み込みにより転移能が亢進したと言う報告³⁵も見られ、一致した成績は得られていない。今回の腫瘍増殖率と臨床所見との関連は、ヒト腫瘍での細胞増殖と転移との密接な関連を示唆するものと考えられる。その意味で、腫瘍増殖率を把握することは、その腫瘍の転移能を把握することにもつながり、術後経過観察のモニターにもなると考えられる。

DNA 倍体様式が予後因子として有用であることは、種々の腫瘍においてほぼ認められている⁵¹⁻⁷²。しかし、予後因子としては、臨床的な病期分類の因子である肝転移、腹膜播種、リンパ節転移などに比べ劣っており、未だ臨床応用されるに至っていないのが現状である。本研究でも単因子解析では、DNA 倍体様式や S 期細胞比率は、有意な予後因子であった。しかし、多変量解析の結果ではそれらの因子は有意ではなく、腫瘍増殖率推測値が、最も有意であり、肝転移などよりも予後因子として重要であった。この解析結果は、腫瘍の増殖と転移との密接な関連を予後の面から裏づけると同時に、腫瘍増殖率が癌の悪性度を最も反映する因子であることを示すものと考えられた。腫瘍増殖率は、生検材料から推測が可能であり、胃癌の悪性度を最も良く表現する指標として、臨床応用しうる可能性が示唆された。

結 論

胃癌の細胞動態解析を詳細に検討することにより、腫瘍増殖の最も優れた指標を求め、その臨床的意義を

検討した。また、その臨床応用の可能性を検討した。

1. 胃癌組織の世代時間は、 7.6 ± 5.2 日であった。腫瘍増殖率は、世代時間の逆数で求められ、BrdUrd 標識率と DNA 指標の比がその最も良い指標であった ($p < 0.0001$)。

2. BrdUrd 標識率と DNA 指標より求められた腫瘍増殖率推測値は、肝転移・リンパ節転移など転移と密接に関連し、肝転移を凌ぐもっとも重要な予後因子であった ($p < 0.0001$)。

3. 生検材料より求められた腫瘍増殖率推測値は、生体内での成績ときわめて良く一致した ($p < 0.0001$)。

以上より、腫瘍増殖率は胃癌の悪性度を最も良く表現すると考えられ、その術前における予測が可能であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師、宮崎逸夫教授に深甚の謝意を表します。また、御校閲を賜りましたが研究所化学療法部佐々木琢磨教授に深謝いたします。さらに、終始、研究に御指導を賜りました米村豊講師に深く感謝致します。また、研究に御協力を頂きました第二外科の諸兄に感謝いたします。

文 献

- 1) Yonemura, Y., Sugiyama, K., Fujimura, T., Arexabara, X., Kamata, T., Kosaka, T., Yamaguti, A., Miwa, K. & Miyazaki, I.: Correlation of DNA ploidy and proliferative activity in human gastric cancer. *Cancer*, 62, 1492-1502 (1988).
- 2) Kusama, S., Spratt, J. S. & Donegan, W. L.: The gross rates of growth of human mammary carcinoma. *Cancer*, 30, 594-599 (1972).
- 3) Mizuno, T., Masaoka, A., Ichimura, H., Shibata, K., Tanaka, H. & Niwa, H.: Comparison of actual survivorship after treatment with survivorship predicted by actual tumor-volume doubling time from tumor diameter at first observation. *Cancer*, 53, 2716-2720 (1984).
- 4) Okazaki, N., Yoshino, M., Yoshida, T., Suzuki, M., Moriyama, N., Takayasu, K., Makuuchi, M., Yamazaki, S., Hasegawa, H., Noguchi, M., & Hirohashi, S.: Evaluation of the prognosis for small hepatocellular carcinoma based on tumor volume doubling time. *Cancer*, 63, 2207-2210 (1989).
- 5) Kallioniemi, O., Punnonen, R., Mattila, J.,

- Lehtinen, M. & Koivula, T.: Prognostic significance of DNA index, multiploidy, and S-phase fraction in ovarian cancer. *Cancer*, **61**, 334-339 (1988).
- 6) Meyer, J. S. & Prioleau, P. G.: S-phase fractions of colorectal carcinomas related to pathologic and clinical features. *Cancer*, **48**, 1221-1228 (1981).
- 7) Volm, M., Hahn, E. W., Mattern, J., Muller, T., Moykopf, I. V. & Weber, E.: Five-year follow-up study of independent clinical and flow cytometric prognostic factors for the survival of patients with non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res.*, **48**, 2923-2928 (1988).
- 8) Staab, H. J., Anderer, F. A., Hornung, A., Stumpf, E., & Fischer, R.: Doubling time of circulating CEA and its relation to survival of patients with recurrent colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, **46**, 773-781 (1982).
- 9) 貫野 徹, 針原重義, 金 鎬俊, 木村修二, 田守昭博, 黒木哲夫, 溝口靖紘, 小林純三, 岡奈丈之, 中村健治, 山本祐夫: 肝細胞癌における血中 α -fetoprotein 倍加時間からみた肝動脈塞栓術の評価. 癌と治療, **15**, 683-687 (1988).
- 10) 米村 豊, 沢 敏次, 橋本哲夫, 嶋 祐一, 杉山和夫, 西村元一, 鎌田 徹, 藤村 隆, 三輪晃一, 宮崎逸夫: 胃癌における癌関連抗原発現様式と予後. 日消外会誌, **20**, 2299-2304 (1987).
- 11) Sasaki, K. & Takahasi, M.: Preservation of cell cycle characteristics in solid tumor vitro. *Cancer Res.*, **40**, 4810-4812 (1980).
- 12) 藤田哲也: 増殖と生長. 現代病理学大系9A腫瘍I (飯島宗一, 石川栄世, 影山圭三, 島峰徹郎, 森亘編), 第一版, 4-40頁, 中山書店, 東京, 1984.
- 13) Cox, D. R.: Pegression models and life tables. *J. R. Statistics Soc. B.*, **34**, 187-220 (1972).
- 14) 胃癌研究会編: 胃癌取扱規約. 改訂11版, 1-71頁, 金原 出版, 東京, 1985.
- 15) Steel, G. G.: Growth Kinetics of Tumors, 1st ed., p86-216, Oxford University Press, London, 1977.
- 16) Terz, J. J., Curutchet, H. P. & Lawrence, W.: Analysis of the cell kinetics of human solid tumors. *Cancer*, **28**, 1100-1110 (1971).
- 17) 服部隆則, 有菌直樹: 大腸粘膜の細胞動態. 臨床と病理, **8**, 874-880 (1988).
- 18) Padilla, G. M. & McCarty, K. S.: Genetic Expression in the Cell Cycle, 1st ed., p103-128, Academic Press, New York, 1982.
- 19) Gratzner, H. G.: Monoclonal Antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, **218**, 474-475 (1982).
- 20) Dolbeare, F., Gratzner, H. G., Pallavicini, M. G. & Gray, J. W.: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *sProc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5573-5577 (1983).
- 21) Fujita, S.: Analysis of cytokinetics by means of feulgen cytofluorometry combined with ^3H -thymidine autoradiography. *Exp. Cell Res.*, **88**, 395-401 (1974).
- 22) Begg, A. C., McNally, N. J., Shriev, D. C. & Karcher, H.: A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample. *Cytometry*, **6**, 620-626 (1985).
- 23) Riccardi, A., Danova, M., Wilson, G., Brugnatelli, S., Girino, McNally, N. J. & Ascarì, E.: Cell kinetics in human malignancies studied with in vivo administration of bromodeoxyuridine and flow cytometry. *Cancer Res.*, **48**, 6238-6245 (1988).
- 24) Lipkin, M., Sherlock, P. & Bell, B.: Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man. *J. Clin. Invest.*, **42**, 767-776 (1963).
- 25) 田中公夫, 鎌田七男: 癌と染色体. 癌と治療, **42**, 249-274 (1982).
- 26) Yonemura, Y., Ohyama, S., Sigiya, K., Kamata, T., Aretxabara, X., Kimura, H., Kosaka, T., Yamaguti, A., Miwa, K. & Miyazaki, I.: Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA ploidy patterns and S-phase fraction in gastric carcinoma. *Cancer Res.*, **50**, 509-514 (1990).
- 27) Napalkov, N. P., Anisimov, V. N., Likhachev, A. J. & Tomatis, L.: 5-Bromodeoxyuridine-induced carcinogenesis and its modification by persistent estrus syndrome, unilateral nephrectomy, and X-irradiation in rats. *Cancer Res.*, **49**, 318-323 (1989).
- 28) 大山繁和, 山口明夫, 米村 豊, 竹川 茂, 小坂

健夫, 三輪晃一, 宮崎逸夫: 大腸癌の転移と細胞回転. 日外会誌, 91, 677-682 (1990).

29) 石川 啓, 田川 泰, 宮下光世, 横田美登志, 福田 豊, 中越 亨, 下山孝俊, 三浦敏夫, 三田正雄: 大腸内視鏡下生検材料を用いた核DNA定量の基礎的検討. Gastroenterol. Endosc., 30, 1950-1955 (1988).

30) Weiss, L.: A pathobiologic overview of metastasis. Seminars in Oncology, 1, 5-17 (1977).

31) Nicolson, G. L.: Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. Biochem. Biophys. Acta, 948, 175-224 (1988).

32) Hart, I. R., Talmadge, J. E. & Fidler, I. J.: Metastatic behavior of a murine reticulum cell sarcoma exhibiting organ-specific growth.

Cancer Res., 41, 1281-1287 (1981).

33) Nicolson, G. L. & Dulski, K. M.: Organ specificity of metastatic tumor colonization is related to organ-selective growth properties of malignant cells. Int. J. Cancer, 38, 289-294 (1986).

34) Suzuki, N., Frapart, M., Grdina, D. J., Meistrich, M. L. & Withers, H. R.: Cell cycle dependency of metastatic lung colony formation. Cancer Res., 37, 3690-3693 (1977).

35) Price, J. E., Aukerman, S. L., Ananthaswamy, H. N., McIntyre, B. W., Schackert, G., Schackert, H. K. & Fidker, I. J.: Metastatic potential of cloned murine melanoma cells transfected with activated c-Ha-ras. Cancer Res., 49, 4274-4281 (1989).

Proliferative Activity and Malignancy in Human Gastric Cancers: Clinical Significance of Proliferation Rate and Its Clinical Application Shigekazu Ohyama, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-J. J. J. Med. Soc., 99, 680-691 (1990)

Key words cell kinetics, proliferation rate, bromodeoxyuridine, gastric cancer

Abstract

The present study was performed to examine the putative indicators useful for predicting the proliferative activity of human gastric cancer and also to evaluate their clinical significance. One hundred seventy two patients with gastric cancer were included in this study. All patients received 200-1000 mg bromodeoxyuridine before laparotomy. In 56 patients, tumor cell kinetics studies on tumor cells were done by means of the migration chase method. The results of the studies revealed that the DNA synthesis time (T_s) was prolonged in the tumors, especially in aneuploid tumors, compared with normal mucosal tissue. T_s correlated with both BrdUrd labeling indices (LI) ($r=0.453$, $p<0.0005$) and DNA indices (DI) ($r=0.534$, $p<0.0005$), indicating that T_s was significantly prolonged in the tumors having high S-phase fractions or DNA aneuploidy. The result of multivariate analysis indicated that LI/DI was the most potent indicator for predicting the proliferation rate (PR) as calculated by the formula LI/T_s , and shown to be correlated significantly with PR ($r=0.863$, $p<0.0001$). As clearly shown by the Cox's proportional hazard model, the predicted proliferation rate (pPR) was the most significant factor in the prognosis, since the pPR correlated clinically with liver and lymph node metastasis. In vitro pPR obtained by in vitro BrdUrd labeling of the biopsied specimens, correlated quite significantly with in vivo pPR ($r=0.960$, $p<0.0001$). In conclusion, this study demonstrates that the proliferation rate is the most important factor for evaluating the degree of malignancy of human gastric cancers with metastatic ability and this rate would be helpful in deciding the strategy for the treatment of individual patients, and in judging their prognosis.